



(21)(A1) **2,223,877**  
(86) 1996/07/10  
(87) 1997/01/30

(72) KÄSLER, Bruno, DE  
(72) SAHM, Hermann, DE  
(72) STAHHMANN, Klaus-Peter, DE  
(72) SCHMIDT, Georg, DE  
(72) BÖDDECKER, Theo, DE  
(72) SEULBERGER, Harald, DE  
(71) BASF AKTIENGESELLSCHAFT, DE  
(71) FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH, DE  
(51) Int.Cl. <sup>6</sup> C12N 15/60, C12P 25/00  
(30) 1995/07/13 (19525281.0) DE  
(30) 1995/12/06 (19545468.5) DE

(54) **PROCEDE DE PRODUCTION DE RIBOFLAVINE AU MOYEN  
DE MICRO-ORGANISMES A ACTIVITE  
D'ISOCITRATLYASE MODIFIEE**  
(54) **PREPARATION OF RIBOFLAVIN USING MICROORGANISMS  
HAVING AN ALTERED ISOCITRATE LYASE ACTIVITY**

(57) Selon le procédé décrit, on utilise des microbes pour produire de la riboflavine. On cultive les micro-organismes producteurs de riboflavine dans un milieu de culture puis on isole la riboflavine ainsi produite. Le procédé se caractérise en ce que l'on utilise des micro-organismes dont l'activité endogène d'isocitratlyase (ICL) a été modifiée.

(57) A microbial riboflavin-production process is disclosed. Riboflavin-producing micro-organisms are cultivated in a culture medium and the thus produced riboflavin is then isolated. The process is characterised in that the endogenous isocitratlyase activity (ICL) of the micro-organisms used has been modified.

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6:  C12P 25/00, C12N 15/60, 15/31		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/03208  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 30. Januar 1997 (30.01.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/03009  (22) Internationales Anmelde datum: 10. Juli 1996 (10.07.96)			(81) Bestimmungsstaaten: CA, CN, JP, KR, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(30) Prioritätsdaten: 195 25 281.0 13. Juli 1995 (13.07.95) DE 195 45 468.5 6. December 1995 (06.12.95) DE			<b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE). FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH [DE/DE]; D-52428 Jülich (DE).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KÄSLER, Bruno [DE/DE]; Magdeburger Strasse 72, D-67071 Ludwigshafen (DE). SAHM, Hermann [DE/DE]; Wendelinusstrasse 71, D-52428 Jülich (DE). STAHHMANN, Klaus-Peter [DE/DE]; Wilhelmstrasse 11, D-52428 Jülich (DE). SCHMIDT, Georg [DE/DE]; Heerstrasse 10, D-52457 Aldenhoven (DE). BÖDDECKER, Theo [DE/DE]; Robert-Koch-Strasse 7, D-52428 Jülich (DE). SEULBERGER, Harald [DE/DE]; Adalbert-Stifter-Strasse 4, D-69221 Dossenheim (DE).			
(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; D-67056 Ludwigshafen (DE).			
(54) Titel: RIBOFLAVIN-PRODUCTION PROCESS BY MEANS OF MICRO-ORGANISMS WITH MODIFIED ISOCITRATLYASE ACTIVITY			
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON RIBOFLAVIN MITTELS MIKROORGANISMEN MIT VERÄNDERTER ISOCITRATLYASE-AKTIVITÄT			
(57) Abstract  A microbial riboflavin-production process is disclosed. Riboflavin-producing micro-organisms are cultivated in a culture medium and the thus produced riboflavin is then isolated. The process is characterised in that the endogenous isocitratlyase activity (ICL) of the micro-organisms used has been modified.			
(57) Zusammenfassung  Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Riboflavin durch Kultivierung von Riboflavin produzierenden Mikroorganismen in einem Nährmedium und anschließender Isolierung des hergestellten Riboflavins, dadurch gekennzeichnet, daß Mikroorganismen verwendet werden, bei denen die endogene Isocitratlyase (ICL) Aktivität verändert wurde.			

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGEN  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : <b>C12P 25/00, C12N 15/60, 15/31</b>		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 97/03208</b>  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>30. Januar 1997 (30.01.97)</b>
(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP96/03009</b>		(81) Bestimmungsstaaten: CA, CN, JP, KR, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: <b>10. Juli 1996 (10.07.96)</b>		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(30) Prioritätsdaten: 195 25 281.0 13. Juli 1995 (13.07.95) DE 195 45 468.5 6. December 1995 (06.12.95) DE			
(71) Anmelder ( <i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i> ): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE). FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH [DE/DE]; D-52428 Jülich (DE).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder ( <i>nur für US</i> ): KÄSLER, Bruno [DE/DE]; Magdeburger Strasse 72, D-67071 Ludwigshafen (DE). SAHM, Hermann [DE/DE]; Wendelinusstrasse 71, D-52428 Jülich (DE). STAHHANN, Klaus-Peter [DE/DE]; Wilhelmstrasse 11, D-52428 Jülich (DE). SCHMIDT, Georg [DE/DE]; Heerstrasse 10, D-52457 Aldenhoven (DE). BÖDDECKER, Theo [DE/DE]; Robert-Koch-Strasse 7, D-52428 Jülich (DE). SEULBERGER, Harald [DE/DE]; Adalbert-Stifter-Strasse 4, D-69221 Dossenheim (DE).			
(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; D-67056 Ludwigshafen (DE).			
(54) Title: RIBOFLAVIN-PRODUCTION PROCESS BY MEANS OF MICRO-ORGANISMS WITH MODIFIED ISOCITRATLYASE ACTIVITY			
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON RIBOFLAVIN MITTELS MIKROORGANISMEN MIT VERÄNDERTER ISOCITRATLYASE-AKTIVITÄT			
(57) Abstract			
A microbial riboflavin-production process is disclosed. Riboflavin-producing micro-organisms are cultivated in a culture medium and the thus produced riboflavin is then isolated. The process is characterised in that the endogenous isocitratlyase activity (ICL) of the micro-organisms used has been modified.			
(57) Zusammenfassung			
Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Riboflavin durch Kultivierung von Riboflavin produzierenden Mikroorganismen in einem Nährmedium und anschließender Isolierung des hergestellten Riboflavins, dadurch gekennzeichnet, daß Mikroorganismen verwendet werden, bei denen die endogene Isocitratlyase (ICL) Aktivität verändert wurde.			

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Oesterreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estonia	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauritanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Verfahren zur Herstellung von Riboflavin mittels Mikroorganismen mit veränderter Isocitratlyase-Aktivität

5 Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Riboflavin mittels Mikroorganismen mit veränderter Isocitratlyase-Aktivität.

10 Das Vitamin B<sub>2</sub>, auch Riboflavin genannt, ist für Mensch und Tier essentiell. Bei Vitamin-B<sub>2</sub>-Mangel treten Entzündungen der Mund- und Rachenschleimhäute, Risse in den Mundwinkeln, Juckreiz und Entzündungen in den Hautfalten u.ä. Hautschäden, Bindegautentzündungen, verminderte Sehschärfe und Trübung der Hornhaut auf. Bei Säuglingen und Kindern können Wachstumsstillstand und Gewichtsabnahme eintreten. Das Vitamin B<sub>2</sub> hat daher wirtschaftliche Bedeutung insbesondere als Vitaminpräparat bei Vitaminmangel sowie als Futtermittelzusatz. Daneben wird es auch als Lebensmittelfarbstoff, beispielsweise in Mayonnaise, Eiscreme, Pudding etc., eingesetzt.

20 Die Herstellung von Riboflavin erfolgt entweder chemisch oder mikrobiell. Bei den chemischen Herstellungsverfahren wird das Riboflavin in der Regel in mehrstufigen Prozessen als reines Endprodukt gewonnen, wobei relativ kostspielige Ausgangsprodukte - wie beispielsweise D-Ribose - eingesetzt werden müssen.

25 Eine Alternative zur chemischen Herstellung des Riboflavins bietet die Herstellung dieses Stoffes durch Mikroorganismen. Als Ausgangsprodukte für die mikrobielle Synthese können nachwachsende Rohstoffe, wie beispielsweise pflanzliche Öle, eingesetzt werden.

30 35 Die Herstellung von Riboflavin durch Fermentation von Pilzen wie *Ashbya gossypii* oder *Eremothecium ashbyii* ist bekannt (The Merck Index, Windholz et al., eds. Merck & Co., Seite 1183, 1983); aber auch Hefen, wie z.B. *Candida* oder *Saccharomyces*, und Bakterien, wie *Clostridium*, sind zur Riboflavinproduktion geeignet. Riboflavin-überproduzierende Bakterienstämme sind beispielsweise in der EP 405370 beschrieben, wobei die Stämme durch Transformation der Riboflavin-Biosynthese-Gene aus *Bacillus subtilis* erhalten wurden. Diese Prokaryonten-Gene sind aber für ein rekombinantes Riboflavin-Herstellungsverfahren mit Eukaryonten wie *Saccharomyces cerevisiae* oder *Ashbya gossypii* ungeeignet.

In WO 93/03183 ist die Klonierung der für die Riboflavin-Bio-synthese spezifischen Gene aus dem eukaryontischen Organismus *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben. Mittels dieser Gene können rekombinante eukaryontische Mikroorganismen konstruiert werden,  
5 die eine effiziente Riboflavinproduktion gestatten.

Häufig liegen jedoch die Ausgangsprodukte und Substrate der Riboflavinbiosynthese-Enzyme in dem Mikroorganismus in limitierter Menge vor, so daß trotz Erhöhung der Riboflavinbiosynthese -  
10 Aktivität keine Steigerung in der Riboflavinproduktion erreicht wird.

Es bestand daher die Aufgabe ein verbessertes mikrobielles Verfahren zur Produktion von Riboflavin bereitzustellen, das Mikro-  
15 organismen verwendet, die keine oder eine geringere Substratlimi-tierung besitzen und somit eine erhöhte Riboflavinproduktion erlauben.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß die verwen-deten Mikroorganismen eine Veränderung in ihrer endogenen Isoci-  
20 tratlyaseaktivität besitzen. Die Veränderung ist gegenüber dem un-veränderten Ausgangsstamm zu ermitteln. Es gibt eine Vielzahl von Möglichkeiten, solche Mikroorganismen mit veränderter ICL-  
Aktivität zu erhalten.

25 Eine Möglichkeit besteht darin, das endogene ICL-Gen so zu verändern, daß es für ein Enzym mit gegenüber dem Ausgangsenzym erhöhter ICL-Aktivität codiert. Eine Erhöhung der Enzymaktivität kann beispielsweise erreicht werden, indem durch Veränderung des katalytischen Zentrums ein erhöhter Substratumsatz erfolgt oder  
30 indem die Wirkung von Enzyminhibitoren aufgehoben wird. Auch kann eine erhöhte Enzymaktivität durch Erhöhung der Enzmysynthese, beispielsweise durch Genamplifikation oder durch Ausschaltung von Faktoren, die die Enzymbiosynthese reprimieren, hervorgerufen  
35 werden. Die endogene ICL-Aktivität wird vorzugsweise durch Mutation des endogenen ICL-Gens erhöht. Derartige Mutationen können entweder nach klassischen Methoden ungerichtet erzeugt werden, wie beispielsweise durch UV-Bestrahlung oder mutationsauslösenden Chemikalien oder gezielt mittels gentechnischer Methoden wie  
40 Deletionen, Insertionen oder Substitutionen.

Die ICL-Genexpression wird durch Erhöhen der ICL-Genkopienzahl und / oder durch Verstärkung regulatorischer Faktoren, die die ICL-Genexpression positiv beeinflussen, erhöht. So kann eine Ver-  
45 stärkung regulatorischer Elemente vorzugsweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und Enhancer verwendet werden. Daneben ist aber auch

eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der m-RNA verbessert wird. Zur Erhöhung der Genkopienzahl wird das ICL-Gen in ein Genkonstrukt bzw. in einen Vektor eingebaut, der vorzugsweise das dem ICL-Gen zugeordnete 5 regulatorische Gensequenzen enthält, insbesondere solche, die die Genexpression verstärken. Anschließend wird ein Riboflavin-produzierenden Mikroorganismus mit dem das ICL-Gen enthaltende Genkonstrukt transformiert.

10 Das ICL-Gen wird vorzugsweise aus Mikroorganismen, insbesondere aus dem Pilz *Ashbya gossypii*, isoliert. Für die Isolierung des Gens kommen aber auch alle weiteren Organismen, deren Zellen die anaplerotische Sequenz des Glyoxylat-Cyclus und damit die Isocitratlyase enthalten, also auch Pflanzen, in Betracht. Die Isolierung 15 des Gens kann durch homologe oder heterologe Komplementation einer im ICL-Gen defekten Mutante oder auch durch heterologes Probing oder PCR mit heterologen Primern erfolgen. Zur Subklonierung kann das Insert des komplementierenden Plasmids anschließend durch geeignete Schnitte mit Restriktionsenzymen in 20 der Größe minimiert werden. Nach Sequenzierung und Identifizierung des putativen Gens erfolgt eine paßgenaue Subklonierung durch Fusions-PCR. Plasmide, die die so erhaltenen Fragmente als Insert tragen, werden in die ICL-Gen-defekte Mutante eingebracht, die auf Funktionalität des ICL-Gens getestet wird. Funktionelle 25 Konstrukte werden schließlich zur Transformation eines Riboflavin-Produzenten eingesetzt.

Nach Isolierung und Sequenzierung sind Isocitratlyasegene mit Nukleotidsequenzen erhältlich, die für die in SEQ ID NO:2 angegebene 30 Aminosäuresequenz oder deren Allelvariationen kodieren. Allelvariationen umfassen insbesondere funktionelle Derivate, die durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus der in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz erhältlich sind, wobei die ICL-Aktivität aber erhalten bleibt.

35 Den Isocitratlyasegenen ist insbesondere ein Promotor der Nukleotidsequenz von Nukleotid 176 bis 550 gemäß SEQ ID NO:1 oder eine im wesentlichen gleichwirkende DNA-Sequenz vorgeschaltet. So kann beispielsweise dem Gen ein Promotor vorgeschaltet sein, der 40 sich von dem Promotor mit der angegebenen Nukleotidsequenz durch ein oder mehrere Nukleotidaustausche, durch Insertion(en) und/oder Deletion(en) unterscheidet, ohne daß aber die Funktionalität bzw. Wirksamkeit des Promotors beeinträchtigt ist. Des Weiteren kann der Promotor auch durch Veränderung seiner Sequenz in seiner 45 Wirksamkeit erhöht oder komplett durch wirksamere Promotoren ausgetauscht werden.

Dem ICL-Gen können des weiteren regulatorische Gensequenzen bzw. Regulatorgene zugeordnet sein, die insbesondere die ICL-Gen-Aktivität erhöhen. So können dem ICL-Gen beispielsweise sog. "enhancer" zugeordnet sein, die über eine verbesserte Wechselwirkung zwischen RNA-Polymerase und DNA eine erhöhte ICL-Genexpression bewirken.

Dem Isocitratlyasegen mit oder ohne vorgeschaltetem Promotor bzw. mit oder ohne Regulatoren können ein oder mehrere DNA-Sequenzen vor- und/oder nachgeschaltet sein, so daß das Gen in einer Genstruktur enthalten ist.

Durch Klonierung des ICL-Gens sind Plasmide bzw. Vektoren erhältlich, die das ICL-Gen enthalten und - wie bereits oben erwähnt - zur Transformation eines Riboflavin-Produzenten geeignet sind. Die durch Transformation erhältlichen Zellen, bei denen es sich vorzugsweise um transformierte Zellen von *Ashbya gossypii* handelt, enthalten das Gen in replizierbarer Form, d.h. in zusätzlichen Kopien auf dem Chromosom, wobei die Genkopien durch homologe Rekombination an beliebigen Stellen des Genoms integriert werden, und/oder auf einem Plasmid bzw. Vektor.

Eine weitere Möglichkeit, Mikroorganismen mit veränderter ICL-Aktivität zu erzeugen, besteht darin, Mikroorganismen mit einer Resistenz gegenüber auf ICL hemmend wirkenden Substanzen zu erzeugen und diese zu selektionieren. Hemmstoffe der Isocitratlyase (ICL) sind dem Fachmann bekannt und beispielsweise in *Handbook of Enzyme Inhibitors*, Herausgeber: Hellmut Zollner, Verlag Chemie, Weinheim, 1993, auf Seite 291 aufgeführt. Besonders geeignete Hemmstoffe sind Phosphoenolpyruvat (PEP), 6-P-Gluconat, Maleat, insbesondere aber Itaconat und Oxalat.

Werden nunmehr Riboflavin produzierende Mikroorganismen-Stämme in Gegenwart solcher Hemmstoffe kultiviert, zeigt sich überraschenderweise, daß die Riboflavinbildung gehemmt ist. Dies äußert sich auf Kulturplatten in der Ausbildung von Kolonien, die nicht gelb werden, sondern weiß bleiben. Mit diesem System sind daher Stämme leicht erkennbar, die gegen eine Isocitratlyase-Hemmung resistent sind, da solche Stämme auch in Gegenwart von Hemmstoff Riboflavin bilden und daher gelb gefärbte Kolonien ausbilden. Derartige Stämme können entweder durch Spontanmutation entstehen oder indem entsprechende Mutationen durch gängige Methoden, wie beispielsweise chemisch oder durch UV-Bestrahlung, induziert werden. Es können somit Mikroorganismen-Stämme gewonnen werden, die einen erhöhten Anteil an Riboflavin in das Kulturmedium ausscheiden. Als resisterter Stamm mit erhöhter Riboflavinbildung wurde ins-

besondere der bei der DSM unter der Nr. 10067 hinterlegte *Ashbya gossypii*-Stamm erhalten.

Als Mikroorganismus werden in dem erfindungsgemäßen Verfahren 5 bevorzugt Pilze eingesetzt. Geeignete Pilze sind beispielsweise solche, die in Indian Chem Engr. Section B. Vol 37, No 1,2 (1995) auf Seite 15, Tabelle 6 aufgeführt sind.

Insbesonders sind solche der Gattungen *Pichia*, *Eremothetium* und 10 *Ashbya*, besonders *Ashbya gossypii* geeignet.

Es können aber auch andere Mikroorganismen als Pilze, beispielsweise Bakterien, insbesondere die, die in Indian Chem Engr. Section B. Vol 37, No 1,2 (1995) auf Seite 16, Tabelle 6 aufgeführt sind, eingesetzt werden. 15

Beispiel 1:

Erstellung einer genomischen Genbank aus *Ashbya gossypii*

20 Zur Erstellung einer genomischen DNA-Bank wurde chromosomal DNA nach der Methode von Wright und Philippsen (1991, Gene 109: 99-105) isoliert. Die DNA wurde partiell mit Sau 3A verdaut und mit einem Saccharose-Dichtegradienten fraktioniert. Die größten Fragmente (Figur 4) wurden mit dem Bam HI geschnittenen 25 *E.coli*, *S.cerevisiae* Shuttlevektor YEP 352 (J.E. Hill et al., 1993, Yeast 2: 163-167) ligiert. Mit diesem Ligationsansatz wurde *E.coli* DH5  $\alpha$  transformiert Von Platten mit Ampicillin und X-Gal wurden 3600 Kolonien isoliert, die durch ihre weiße Farbe als Klone mit Insert tragendem Plasmid erkennbar waren. Die Untersuchung von dreißig solcher zufällig ausgewählter Klone ergab, daß tatsächlich alle ein Plasmid trugen, diese Inserts im Größenbereich 7-18 kb hatten und alle Inserts verschieden waren, was anhand der Restektionsmuster erkennbar war. Aufgrund einer Genomgröße von  $7 \times 10^3$  kb für *Ashbya gossypii* liegt die Wahrscheinlichkeit, daß jedes Gen in dieser Genbank enthalten ist, bei 97 % - 35 99,99 %. Je 100 Klone wurden auf einer Agarplatte in großen Ausstrichen kultiviert und danach die Plasmide als Pool präpariert. Die Genbank bestand dementsprechend aus 36 Plasmidpools.

40 Beispiel 2:

Selektion des *icl1*-tragenden Genbankfragments

Mit den Plasmidpräparationen der Genbank wurde die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ICL1 $\delta$  *ura3*(fs) (E. Fernández et al., 1992, Eur. J. Biochem. 204: 983-990) transformiert. Diese Mutante ist im ICL1-Gen disruptiert und besitzt im *ura3*-Gen eine Mutation im Leserahmen. Dieser Genotyp führt dazu, daß der Stamm nicht auf

Ethanol als Kohlenstoffquelle wachsen kann und eine Uracil-Auxotrophie zeigt. Im ersten Schritt wurden die mit der Genbank transformierten Hefezellen auf Minimalmedium mit Glucose als einziger Kohlenstoffquelle selektioniert. Aufgrund des auf dem 5 Plasmid vorhandenen ura3-Gens konnten nur die Zellen wachsen, die ein Plasmid aufgenommen hatten, denn das Minimalmedium enthielt kein Uracil. In diesem Schritt wurden 1900 Klone erhalten. Diese wurden durch Replikaplattierung auf ein Minimalmedium mit Ethanol als einziger Kohlenstoffquelle übertragen. Da zum Wachstum auf 10 Ethanol unbedingt die Isocitratlyase als anaplerotisches Enzym nötig ist, konnten nur die Klone wachsen, die auf dem Plasmid das ICL-Gen trugen. Es konnten zwei Klone isoliert werden, die auf Ethanol wuchsen.

15 Beispiel 3:

Überprüfung der Funktionalität des isolierten Genbankfragments

Zur Überprüfung, ob die Komplementation des chromosomalen ICL-Defekts plasmid-kodiert war, wurden die selektionierten Saccharomyces-Klone zweimal auf Vollmedium mit Uracil kultiviert und die erhaltenen Zellen auf Platten vereinzelt. Von 16 bzw. 13 zufällig ausgewählten Klonen wuchsen 7 bzw. 5 nicht mehr auf Minimalmedium mit Glucose. Genau diese Klone wuchsen auch nicht mehr auf Minimalmedium mit Ethanol. Die Kurierung vom Plasmid war also mit dem 25 Verlust der ICL1d-Komplementation korreliert.

Aus einem der beiden Klone wurde das Plasmid wieder isoliert. Es enthielt ein Insert von etwa 8 kb. Erneute Transformation der Saccharomyces. Mutante führte zur Komplementation aller gefundenen Klone. Das 8 kb - Fragment ließ sich durch Sph I auf 2,9 kb, die voll funktionell waren, verkürzen.

Im Rohextrakt der auf Ethanol gewachsenen Transformante war die Isocitratlyase mit einer spezifischen Aktivität von 0,3 U/mg Protein meßbar. Zudem zeigte der Westernblott mit polyklonalen Antikörpern gegen die Ashbya-ICL ein deutliches Signal.

PCR mit von tryptischen Peptiden der ICL abgeleiteten Primern er gab starke Signale der erwarteten Größe. Aus einem zweidimensionalen Elektrophoresegel wurde ein Protein isoliert, mit Trypsin in Peptide zerlegt und durch Edmannabbau ansequenziert. Der Vergleich der Peptidsequenzen mit Datenbanken ergab eine Identität von über 70 % mit der Isocitratlyase aus *Saccharomyces cerevisiae*. Davon abgeleitete Primer wurden zur PCR eingesetzt. 45 Von dem ca. 8 kb großen komplementierenden Genbankfragment wurden 3,3 kb sequenziert (Sanger et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977) 5463-5467). Auf der ermittelten Sequenz konnten durch

Datenbankvergleich zwei kodierende Bereiche gefunden werden. Ein Leserahmen von 1680 Basen (SEQ ID NO:1) zeigt eine 65 %ige Identität zum ICL1-Gen von *Saccharomyces cerevisiae*. Das ICL-Gen liegt 375 Basen upstream von einer Sequenz die 84 % Identität zu 5 einer Ser-tRNA von *Saccharomyces cerevisiae* zeigt (SEQ ID NO:1).

Beispiel 4:

Funktionalität subklonierter ICL in einem E.coli/Hefe/Ashbya - Shuttlevektor

10

Zwei durch Restriktionsverdau erhaltene Fragmente und ein PCR-Produkt des isolierten Genbankfragments (Figur 5) wurden in das von Steiner und Philippse (1994, Mol. Gen. Genet 242: 263-271) konstruierte Plasmid pAG 100 (Figur 6) kloniert. Bei den Fragmenten handelte es sich um ein 2.9 kb Sph I- Fragment ( pAG 100 icl.4) und um ein 2.2 kb Bgl I / Eco RV - Fragment (pAG 100 icl.6). Beide Fragment enthielten die Ser-tRNA. Deshalb wurde zusätzlich eine PCR-Amplifikation des putativen Gens mit daran fusionierten Bam HI - Schnittstellen (pAG 100 icl.8) durchgeführt.

20 Alle drei DNAs wurden in die Bam HI site des Plasmids pAG 100 kloniert. Mit den erhaltenen Plasmiden wurde die Hefemutante *Saccharomyces cerevisiae* ICL1d ura3 (fs) transformiert. Alle drei Konstrukte führten zur vollständigen Komplementation der ICL1d-Disruption d.h. trugen funktionelle Gene.

25

Beispiel 5:

Wirkung der ICL tragenden Plasmide auf die Riboflavinbildung von *Ashbya gossypii*

30 Die Transformation von *Ashbya gossypii* (Methode: Wright und Philippse, 1991, Gene 109: 99-105) mit den oben erklärten Plasmiden führte zu signifikanten Erhöhungen der Riboflavinbildung. Kultiviert wurde in 500 ml Schüttelkolben mit zwei Schikanen, das 50 ml Medium aus 10 g/I Sojaöl, 10 g/I Hefeextrakt und 200 µg/ml

35 Geneticin enthielt. Der Kontrollstamm A.gossypii pAG 100, der ein Plasmid ohne Insert enthielt, produzierte in zwei Tagen  $18,7 \pm 0,1$  mg/l Riboflavin. Die Stämme A. gossypii pAG 100.4 und Agossypii pAG 100.6 produzierten  $31,2 \pm 6,1$  mg/I bzw.  $31,0 \pm 2,0$  mg/I Riboflavin (Figur 7). Eine signifikante Änderung der spezifischen

40 Aktivität der Isocitratlyase war aufgrund der starken Streuung nicht messbar. Der Stamm A. gossypii pAG 100.8 produzierte in einem Medium, das noch durch 3 g/I Glycin supplementiert wurde, innerhalb von drei Tagen  $65 \pm 5,6$  mg/I Riboflavin. Der Kontrollstamm A.gossypii pAG 100 bildete dagegen im direkten Vergleich

45 nur  $29,9 \pm 1,8$  mg/l Riboflavin (Figur 8). Weder in der spezifi-

schen Aktivität der Isocitratlyase noch im Myzeltrockengewicht waren signifikante Unterschiede meßbar.

Beispiel 6:

5 Reinigung einer Isocitratlyase (ICL)

zur Identifizierung von auf ICL hemmend wirkenden Substanzen wurde zunächst die ICL aus *Ashbya gossypii* gereinigt. Die Isolierung und Reinigung des Enzyms erfolgte 10nach Wachstum des Pilz-  
10 mycels auf Pflanzenöl. Die einzelnen Reinigungsschritte sind in der Tabelle 1 zusammengefaßt: Demgemäß enthält ein typischer, aus ca. 25 g Mycel hergestellter Rohextrakt, der durch Zellaufschluß mit einer French-Press gewonnen wurde, 220 Einheiten ICL-  
Aktivität. Etwa 78% davon sind nach Zentrifugation bei 40.000 g  
15 gelöst im Überstand wiederzufinden. Eine anschließende fraktionierte Ammoniumsulfatfällung führt zu einer dreifachen Anreicherung des Enzyms. Nach einer Gelfiltration mit einer Sephadryl S-300 Säule wird die TCL an den Kationenaustauscher Mono S-Sephadrose gebunden und mit NaCl eluiert. Das so erhaltene Präparat ist  
20 homogen in der SDS-Polyacrylamidgelektrophorese und hat eine spezifische Aktivität von 18,4 U/mg.

Beispiel 7:

Identifizierung von ICL-Hemmstoffen

25

Mit dem gereinigten Enzym lassen sich in einem colorimetrischen Test (Dixon, H. und Kornberg, H.L. (1959), Biochem. J. 72, 3: Assay methods for key enzymes of the glyoxylate cycle) Einflüsse von Substanzen auf die Aktivität messen. In Tabelle 2 und Figur 1 sind die Effekte der getesteten Substanzen auf das Enzym zusammengefaßt bzw. dargestellt. Untersucht wurden zum einen Substanzen, die als Metaboliten in der Pilzzelle einen hemmenden Effekt auf das Enzym haben könnten. Darunter zeigten 6-P-Gluconat und Phosphoenolpyruvat die deutlichsten Hemmwirkungen mit über 35 50% bei einer Konzentration von 10 mM. Erheblich besser wirkten jedoch Itakonat und Oxalat, die vermutlich nicht im Stoffwechsel des Pilzes vorkommen. Bereits eine Konzentration von 1 mmol führte zu 78% bzw. 95% Hemmung.

40 Beispiel 8:

Charakterisierung einer mit Itakonat selektionierten Mutante

Durch UV-Bestrahlung von isolierten Sporen des Pilzes lassen sich Mutationen im Erbmaterial erzeugen. Mit einer Strahlendosis, bei 45 der 10-20% der eingesetzten Sporen überleben, erhält man Mutanten, die gegen eine Hemmung der Riboflavinbildung durch Itakonat resistent sind. Eine so isolierte Mutante zeigt bei Wachstum auf

Sojaöl eine 25-fache Riboflavinbildung im Vergleich zum Ausgangsstamm (Figur 2). Die spezifische ICL-Aktivität ist während der Riboflavinbildungsphase um bis zu 15% erhöht (Figur 2). Mit Antikörpern läßt sich zeigen, daß die Proteinmenge erhöht ist. Die ICL aus der Mutante zeigt das gleiche Hemmverhalten durch Itakonat wie der Ausgangsstamm.

Beispiel 9:

Korrelation von Riboflavinbildung und spezifischer ICL-Aktivität

10

Einen überraschenden Hinweis auf einen kausalen Zusammenhang zwischen ICL und Riboflavinbildung liefert die Beobachtung, daß der Pilz, wenn Glucose als Substrat angeboten wird, erst nach Verbrauch der Glucose mit der Produktion beginnt. Genau dann wird 15 auch die ICL, die zuvor durch Glucose reprimiert ist, im Rohextrakt meßbar und steigt bis zu Aktivitäten, wie sie bei Wachstum auf Öl gefunden werden, an (Figur 3).

20

25

30

35

40

45

## (1) ALGEMEINE INFORMATION:

## (i) ANMELDER:

- (A) NAME: BASF Aktiengesellschaft
- (B) STRASSE: Carl-Bosch-Strasse 38
- (C) ORT: Ludwigshafen
- (E) LAND: Bundesrepublik Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: D-67056
- (G) TELEPHON: 0621/6048526
- (H) TELEFAX: 0621/6043123
- (I) TELEX: 1762175170

- (A) NAME: Forschungszentrum Juelich GmbH
- (B) STRASSE: Leo-Brandt-Strasse
- (C) ORT: Juelich
- (E) LAND: Germany
- (F) POSTLEITZAHL: D-52425
- (G) TELEPHON: 02461-61 3004

(ii) ANMELDETITEL: Verfahren zur Herstellung von Riboflavin mittels Mikroorganismen mit veraenderter Isocitratlyase Aktivitaet

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

## (iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 2364 Basenpaare
- (B) ART: Nukleins"ure
- (C) STRANGFORM: Doppel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÄLS: cDNS zu mRNS

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 5' UTR
- (B) LAGE: 1..550

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 551..2233

## (ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: 3'UTR  
 (B) LAGE: 2234..2364

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CGAAAGCGCC AAATACCGGA AACGGCACAG GCGCAGCTCT AATAGCCGTT CCACGATAAC	60
TTTGGAAAGTT ATGGCACTAT GGCCGAGTGG TTAAGGCGAC AGACTTGAAA TCTGTTGGGC	120
TCTGCCCGCG CTGGTTCAAA TCCTGCTGGT GTCGTTATT TTGCCGTTTC TTTTAGATG	180
AAACTCAGGG GCCTTAGTC CGCCCTTTG CCCGCTGATT CATGCCCGC CAGCAACACC	240
GGTTGAGCCG ATCAGCGCAA GAACGCGCAA AGTCACGTAT GGCCCCTAAG AGTTGAGCTC	300
TCCCCCTCGG CTCCCTCCGG GCGCGGAAAA GCCTGCGTCA CCCCATTAAAG TCCGAAACCG	360
CGTTCAAGTG TACTTGGTCC GGGCCAATGT GGTTGCCTCA TCCGAGTCAC CGATACGCAG	420
GTGCGCCCGT CGAGTCACCA TTAGGAGTAG AGCATCTGAT TATATATAGG CCTAGTTACA	480
GCGGTAACAT AGACTGATAG CTCCAGCTCC AGCACTAGCT TGTAGGACAT CTGCGCGACA	540
CCCAGTGAAC ATG TCC CCT TCC GTC AGA GAC GCC CGC AAC GAC CTT GCC	589
Met Ser Pro Ser Val Arg Asp Ala Arg Asn Asp Leu Ala	
1 5 10	
AGC CTG CAA CAG CAG GCA GCC GCC GAA GCC GAG GAT ATT AGG AGA TGG	637
Ser Leu Gln Gln Gln Ala Ala Ala Glu Ala Glu Asp Ile Arg Arg Trp	
15 20 25	
TGG AGC CAG CCA CGG TGG GCG GGC ACC AAG CGC GTG TAC ACG GCC GAG	685
Trp Ser Gln Pro Arg Trp Ala Gly Thr Lys Arg Val Tyr Thr Ala Glu	
30 35 40 45	
GAC ATC GTC AAG CGC CGC GGC ACG TTC CCT GTC GTC GAA TAC CCA TCT	733
Asp Ile Val Lys Arg Arg Gly Thr Phe Pro Val Val Glu Tyr Pro Ser	
50 55 60	
TCC GTA ATG GCG GAC AAG CTC GTG GAG ACA TTG GCG CGG CAC TCG CGC	781
Ser Val Met Ala Asp Lys Leu Val Glu Thr Leu Ala Arg His Ser Arg	
65 70 75	
AAC GGC ACG GTT TCA CAG ACG TTC GGA GTG CTC GAC CCA GTG CAA ATG	829
Asn Gly Thr Val Ser Gln Thr Phe Gly Val Leu Asp Pro Val Gln Met	
80 85 90	
ACG CAA ATG GTG AAG TAT CTG GAC ACG ATT TAC GTG TCT GGC TGG CAA	877
Thr Gln Met Val Lys Tyr Leu Asp Thr Ile Tyr Val Ser Gly Trp Gln	
95 100 105	
TGC AGC GCC ACG GCT TCG ACC TCG AAC GAG CCT GGG CCC GAT CTC GCG	925
Cys Ser Ala Thr Ala Ser Thr Ser Asn Glu Pro Gly Pro Asp Leu Ala	
110 115 120 125	
GAC TAT CCG ATG GAC ACC GTG CCA AAC AAG GTC GAG CAC CTG TTC ATG	973
Asp Tyr Pro Met Asp Thr Val Pro Asn Lys Val Glu His Leu Phe Met	

12

130

135

140

GCG CAG CTG TTC CAC GAC CGG AAA CAG CGC GAG GCC CGC CTG TCG TGC Ala Gln Leu Phe His Asp Arg Lys Gln Arg Glu Ala Arg Leu Ser Cys 145	150	155	1021	
ACT ACC CAG CGC GAG CTC GAC CAA TTG GGG CCT GAG ATT GAC TAC TTG Thr Thr Gln Arg Glu Leu Asp Gln Leu Gly Pro Glu Ile Asp Tyr Leu 160	165	170	1069	
AGG CCG ATT GTC GCT GAC GCA GAC ACC GGC CAC GGC GGG CTA ACA GCC Arg Pro Ile Val Ala Asp Ala Asp Thr Gly His Gly Gly Leu Thr Ala 175	180	185	1117	
GTC TTT AAA CTC ACG AAG ATG TTC ATC GAG CGC GGT GCA GCC GGT ATC Val Phe Lys Leu Thr Lys Met Phe Ile Glu Arg Gly Ala Ala Gly Ile 190	195	200	205	1165
CAC ATG GAG GAC CAG TCC TCC AGC AAC AAA AAG TGC GGG CAC ATG GCG His Met Glu Asp Gln Ser Ser Asn Lys Lys Cys Gly His Met Ala 210	215	220	1213	
GGC CGC TGC GTG ATC CCT GTT CAG GAG CAC ATT AGT CGT TTA GTG ACT Gly Arg Cys Val Ile Pro Val Gln Glu His Ile Ser Arg Leu Val Thr 225	230	235	1261	
GTG CGC ATG TGT GCG GAC GTG ATG CAC TCG AAC CTG GTG CTT GTC GCG Val Arg Met Cys Ala Asp Val Met His Ser Asn Leu Val Leu Val Ala 240	245	250	1309	
AGA ACA GAC TCG GAG GCC GCC ACC TTA CTT AGC TCG AAC ATT GAC GCG Arg Thr Asp Ser Glu Ala Ala Thr Leu Leu Ser Ser Asn Ile Asp Ala 255	260	265	1357	
CGC GAT CAT TAC TAC ATT GTC GGG GCC TCG AAC CCT GAG GTA ACT GTA Arg Asp His Tyr Tyr Ile Val Gly Ala Ser Asn Pro Glu Val Thr Val 270	275	280	285	1405
CCG CTG ATC GAA GTT TTG GAC GCC GCG CAG CAG GCC GGC GCC TCA GGT Pro Leu Ile Glu Val Leu Asp Ala Ala Gln Gln Ala Gly Ala Ser Gly 290	295	300	1453	
GAC AGA TTG GCT CAG CTA GAG GAG GAC TGG TGC AAG AAG GCC AAG TTG Asp Arg Leu Ala Gln Leu Glu Asp Trp Cys Lys Lys Ala Lys Leu 305	310	315	1501	
AGG CTC TTC CAC GAG GCA TTT GCC GAC CAG GTG AAT GCC AGC CCT TCG Arg Leu Phe His Glu Ala Phe Ala Asp Gln Val Asn Ala Ser Pro Ser 320	325	330	1549	
ATC AAA GAC AAG GCG GGC GTT ATT GCC AAA TTT AAC TCA CAG ATC GGG Ile Lys Asp Lys Ala Gly Val Ile Ala Lys Phe Asn Ser Gln Ile Gly 335	340	345	1597	
CCA CAG ACA GGC GCG TCG ATC AGA GAG ATG CGC AAA CTG GGC CGC GAG Pro Gln Thr Gly Ala Ser Ile Arg Glu Met Arg Lys Leu Gly Arg Glu 350	355	360	365	1645

CTG CTC GGG CAG GAC GTC TAC TTC GAC TGG GAC CTG CCT CGC GCT AGA Leu Leu Gly Gln Asp Val Tyr Phe Asp Trp Asp Leu Pro Arg Ala Arg 370 375 380	1693
GAG GGC TTG TAC CGC TAC AAG GGC GGC ACC CAG TGC GCG ATC ATG CGC Glu Gly Leu Tyr Arg Tyr Lys Gly Gly Thr Gln Cys Ala Ile Met Arg 385 390 395	1741
GCA CGC GCG TTC GCG CCG TAC GCC GAC CTG GTC TGG TTC GAA TCC AAC Ala Arg Ala Phe Ala Pro Tyr Ala Asp Leu Val Trp Phe Glu Ser Asn 400 405 410	1789
TTC CCT GAC TTC CAG CAG GCT AAG GAG TTT GCG CAG GGC GTG CGC GAG Phe Pro Asp Phe Gln Gln Ala Lys Glu Phe Ala Gln Gly Val Arg Glu 415 420 425	1837
AAG TTC CCC AAC AAG TGG ATG GCC TAC AAC TTG TCG CCC AGC TTC AAC Lys Phe Pro Asn Lys Trp Met Ala Tyr Asn Leu Ser Pro Ser Phe Asn 430 435 440 445	1885
TGG CCG AAG GCC ATG CCT CCC AAG GAG CAG GAG AAC TAC ATC CAA CGG Trp Pro Lys Ala Met Pro Pro Lys Glu Gln Glu Asn Tyr Ile Gln Arg 450 455 460	1933
CTG GGC GAG ATC GGA TAT GTG TGG CAG TTC ATC ACG CTA GCC GGC CTG Leu Gly Glu Ile Gly Tyr Val Trp Gln Phe Ile Thr Leu Ala Gly Leu 465 470 475	1981
CAT ACC AAT GCC TTG GCC ATC GAC AAC TTC TCG CGC GAA TTC AGC AGG His Thr Asn Ala Leu Ala Ile Asp Asn Phe Ser Arg Glu Phe Ser Arg 480 485 490	2029
TTC GGA ATG CGT GCG TAT GCA CAA GGC ATC CAG CAG AGG GAG ATG GAC Phe Gly Met Arg Ala Tyr Ala Gln Gly Ile Gln Gln Arg Glu Met Asp 495 500 505	2077
GAG GGC GTC GAT GTC CTA AAA CAC CAG AAG TGG GCC GGC GCA GAG TAT Glu Gly Val Asp Val Leu Lys His Gln Lys Trp Ala Gly Ala Glu Tyr 510 515 520 525	2125
GTT GAC AGC ATT CTC AAG CTT GCC CAG GGC GGT GTG TCT TCG ACA GCC Val Asp Ser Ile Leu Lys Leu Ala Gln Gly Val Ser Ser Thr Ala 530 535 540	2173
TCG ATG GGT AAG GGT GTA ACC GAA GAG CAG TTC GGC TCC TCA AAC GGT Ser Met Gly Lys Gly Val Thr Glu Glu Gln Phe Gly Ser Ser Asn Gly 545 550 555	2221
GCC AAA CTA TGATATCATC TCTGAGTCAT TTCTCTCGAC AAGATCCTCG Ala Lys Leu 560	2270
GCCAGACTTC TGGAATATAT ATAACATCGG GTACCCCGAC ATCCCTGCCT TCCGCAACGT	2330
CGCAAGCAGC TGATACGTAT ACTTTAACG CACA	2364

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
 (A) LÄNGE: 560 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Ser Pro Ser Val Arg Asp Ala Arg Asn Asp Leu Ala Ser Leu Gln  
 1 5 10 15

Gln Gln Ala Ala Ala Glu Ala Glu Asp Ile Arg Arg Trp Trp Ser Gln  
 20 25 30

Pro Arg Trp Ala Gly Thr Lys Arg Val Tyr Thr Ala Glu Asp Ile Val  
 35 40 45

Lys Arg Arg Gly Thr Phe Pro Val Val Glu Tyr Pro Ser Ser Val Met  
 50 55 60

Ala Asp Lys Leu Val Glu Thr Leu Ala Arg His Ser Arg Asn Gly Thr  
 65 70 75 80

Val Ser Gln Thr Phe Gly Val Leu Asp Pro Val Gln Met Thr Gln Met  
 85 90 95

Val Lys Tyr Leu Asp Thr Ile Tyr Val Ser Gly Trp Gln Cys Ser Ala  
 100 105 110

Thr Ala Ser Thr Ser Asn Glu Pro Gly Pro Asp Leu Ala Asp Tyr Pro  
 115 120 125

Met Asp Thr Val Pro Asn Lys Val Glu His Leu Phe Met Ala Gln Leu  
 130 135 140

Phe His Asp Arg Lys Gln Arg Glu Ala Arg Leu Ser Cys Thr Thr Gln  
 145 150 155 160

Arg Glu Leu Asp Gln Leu Gly Pro Glu Ile Asp Tyr Leu Arg Pro Ile  
 165 170 175

Val Ala Asp Ala Asp Thr Gly His Gly Leu Thr Ala Val Phe Lys  
 180 185 190

Leu Thr Lys Met Phe Ile Glu Arg Gly Ala Ala Gly Ile His Met Glu  
 195 200 205

Asp Gln Ser Ser Ser Asn Lys Lys Cys Gly His Met Ala Gly Arg Cys  
 210 215 220

Val Ile Pro Val Gln Glu His Ile Ser Arg Leu Val Thr Val Arg Met  
 225 230 235 240

Cys Ala Asp Val Met His Ser Asn Leu Val Leu Val Ala Arg Thr Asp  
 245 250 255

Ser Glu Ala Ala Thr Leu Leu Ser Ser Asn Ile Asp Ala Arg Asp His  
 260 265 270

15

Tyr Tyr Ile Val Gly Ala Ser Asn Pro Glu Val Thr Val Pro Leu Ile  
275 280 285

Glu Val Leu Asp Ala Ala Gln Gln Ala Gly Ala Ser Gly Asp Arg Leu  
290 295 300

Ala Gln Leu Glu Glu Asp Trp Cys Lys Ala Lys Leu Arg Leu Phe  
305 310 315 320

His Glu Ala Phe Ala Asp Gln Val Asn Ala Ser Pro Ser Ile Lys Asp  
325 330 335

Lys Ala Gly Val Ile Ala Lys Phe Asn Ser Gln Ile Gly Pro Gln Thr  
340 345 350

Gly Ala Ser Ile Arg Glu Met Arg Lys Leu Gly Arg Glu Leu Leu Gly  
355 360 365

Gln Asp Val Tyr Phe Asp Trp Asp Leu Pro Arg Ala Arg Glu Gly Leu  
370 375 380

Tyr Arg Tyr Lys Gly Gly Thr Gln Cys Ala Ile Met Arg Ala Arg Ala  
385 390 395 400

Phe Ala Pro Tyr Ala Asp Leu Val Trp Phe Glu Ser Asn Phe Pro Asp  
405 410 415

Phe Gln Gln Ala Lys Glu Phe Ala Gln Gly Val Arg Glu Lys Phe Pro  
420 425 430

Asn Lys Trp Met Ala Tyr Asn Leu Ser Pro Ser Phe Asn Trp Pro Lys  
435 440 445

Ala Met Pro Pro Lys Glu Gln Glu Asn Tyr Ile Gln Arg Leu Gly Glu  
450 455 460

Ile Gly Tyr Val Trp Gln Phe Ile Thr Leu Ala Gly Leu His Thr Asn  
465 470 475 480

Ala Leu Ala Ile Asp Asn Phe Ser Arg Glu Phe Ser Arg Phe Gly Met  
485 490 495

Arg Ala Tyr Ala Gln Gly Ile Gln Gln Arg Glu Met Asp Glu Gly Val  
500 505 510

Asp Val Leu Lys His Gln Lys Trp Ala Gly Ala Glu Tyr Val Asp Ser  
515 520 525

Ile Leu Lys Leu Ala Gln Gly Gly Val Ser Ser Thr Ala Ser Met Gly  
530 535 540

Lys Gly Val Thr Glu Glu Gln Phe Gly Ser Ser Asn Gly Ala Lys Leu  
545 550 555 560

## Patentansprüche

1. Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Riboflavin durch  
5 Kultivierung von Riboflavin produzierenden Mikroorganismen in  
einem Nährmedium und anschließender Isolierung des herge-  
stellten Riboflavins, dadurch gekennzeichnet, daß Mikroorga-  
nismen verwendet werden, bei denen die endogene Isocitrat-  
lyase (ICL) Aktivität verändert wurde.  
10
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die  
Mikroorganismen durch Mutation des endogenen ICL-Gens ein En-  
zym mit höherer ICL-Aktivität aufweisen.  
15
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die  
Mikroorganismen durch eine Erhöhung der ICL-Genkopienzahl  
eine höhere ICL-Genexpression besitzen.  
20
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das  
ICL-Gen mit regulatorischen DNA-Sequenzen funktionell ver-  
knüpft wurde, die eine verstärkte Genexpression des ICL-Gens  
erlauben.  
25
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Mikro-  
organismen mit Resistenz gegenüber auf ICL hemmend wirkenden  
Substanzen verwendet werden.  
30
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die  
Mikroorganismen resistent gegenüber den Stoffen Itakonat oder  
Oxalat sind.  
35
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekenn-  
zeichnet, daß als Mikroorganismus ein Pilz verwendet wird.  
40
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß der  
Pilz aus der Gattung Ashbya verwendet wird.  
45
9. ICL-Gen codierend für die in SEQ ID NO: 2 dargestellte Amino-  
säuresequenz.  
10. Genkonstrukt enthaltend ein ICL-Gen gemäß Anspruch 9.  
11. Genkonstrukt nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß  
das ICL-Gen funktionell mit einem oder mehreren Regulations-  
signalen zur Erhöhung der Genexpression funktionell verknüpft  
wurde.

1/10

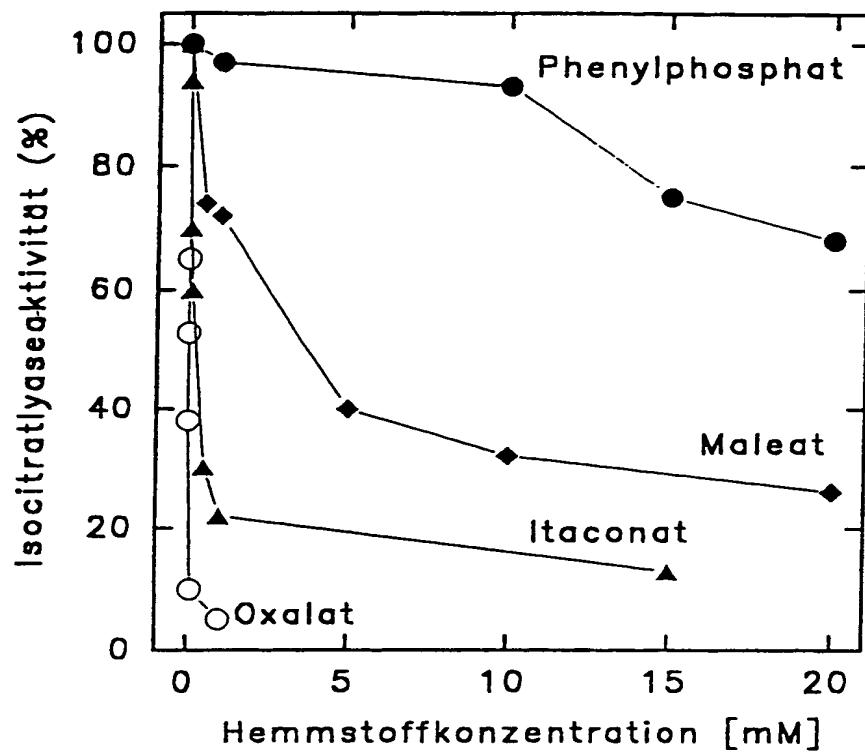
Fraktion	Gesamtaktivität (Units)	Gesamtprotein (mg)	spez. Aktivität (U/mg protein)	Reinigungsfaktor (-fach)	Ausbeute (%)
Rohextrakt	220	1310	0.17	1.0	100
40,000 g Überstand	170	730	0.23	1.3	78
35% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Überstand	160	630	0.25	1.5	72
60% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Pellet	160	300	0.53	3.1	72
Sephadryl S-300 Eluat	52	5	10.8	63	23
Mono S Eluat	35	0.5	18.4	108	16

Tabelle 1.

Hemmstoff	Konzentration (mM)	Hemmung (%)	Hemmtyp
Glucose-6-P	10	<5	
Citrat	10	22	
Fumarat	10	25	
Succinat	10	34	noncompetitive; $K_i$ :15.8 mM
Malat	10	36	
PEP	10	55	hyperbolic mixed-type
6-P-Gluconat	10	60	
Glycin	10	<5	
Aspartat	10	13	
Glutamat	10	15	
Phenylphosphat	10	7	
Maleat	10	68	
Itaconat	1	78	linear mixed-type; $K_i$ :0.17 mM
Oxalat	1	95	noncompetitive; $K_i$ :0.004 mM

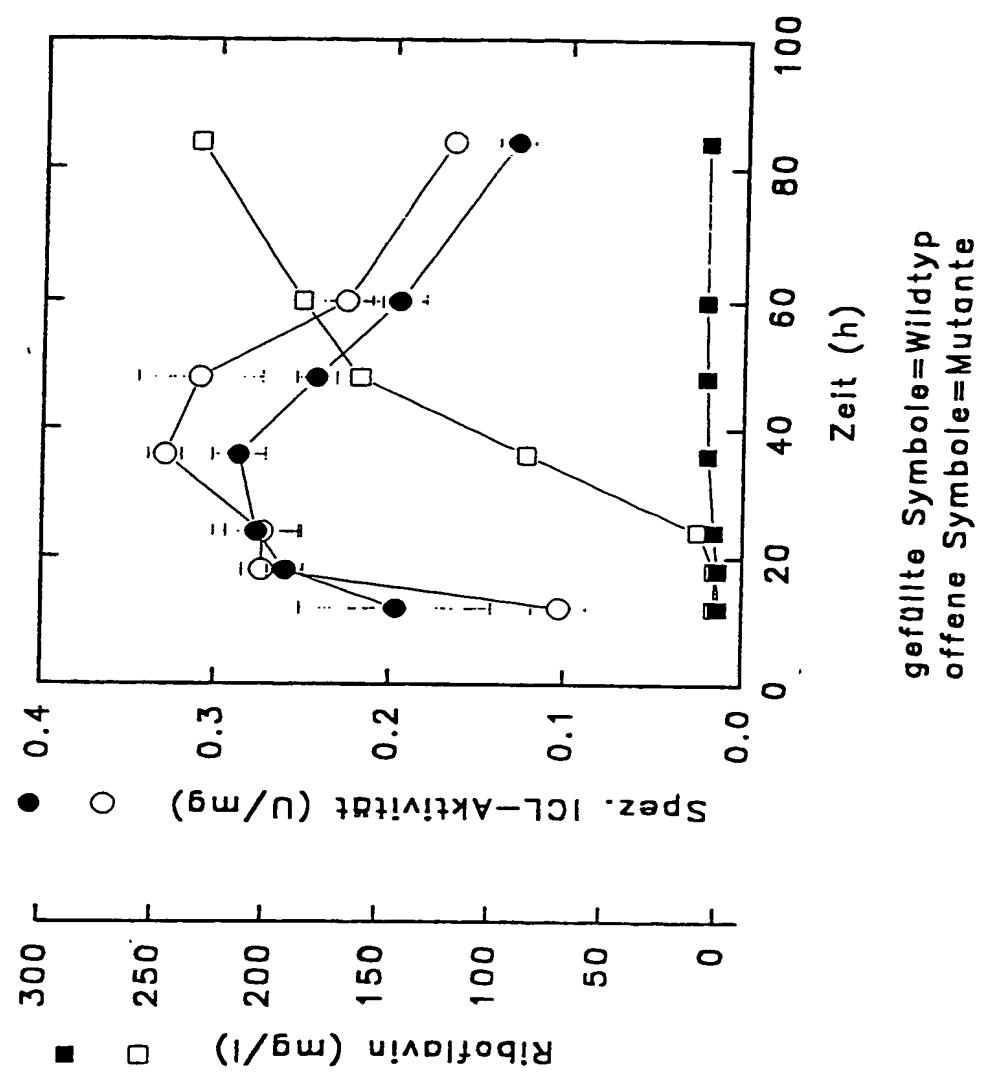
Tabelle 2.

3/10



Figur 1

4/10



Figur 2

5/10

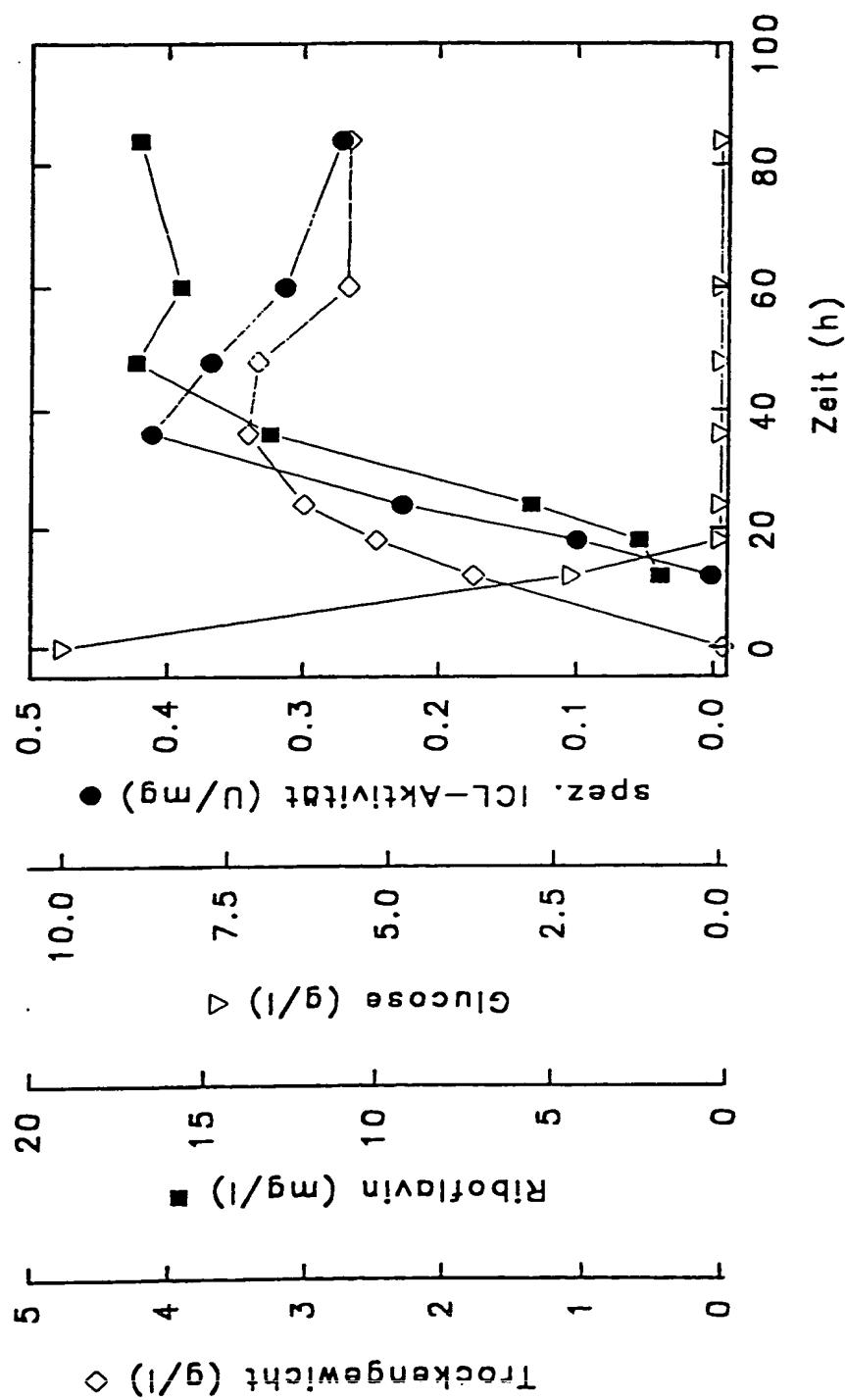


Figure 3

6/10

Standards



23,1 kb

9,4 kb

6,5 kb

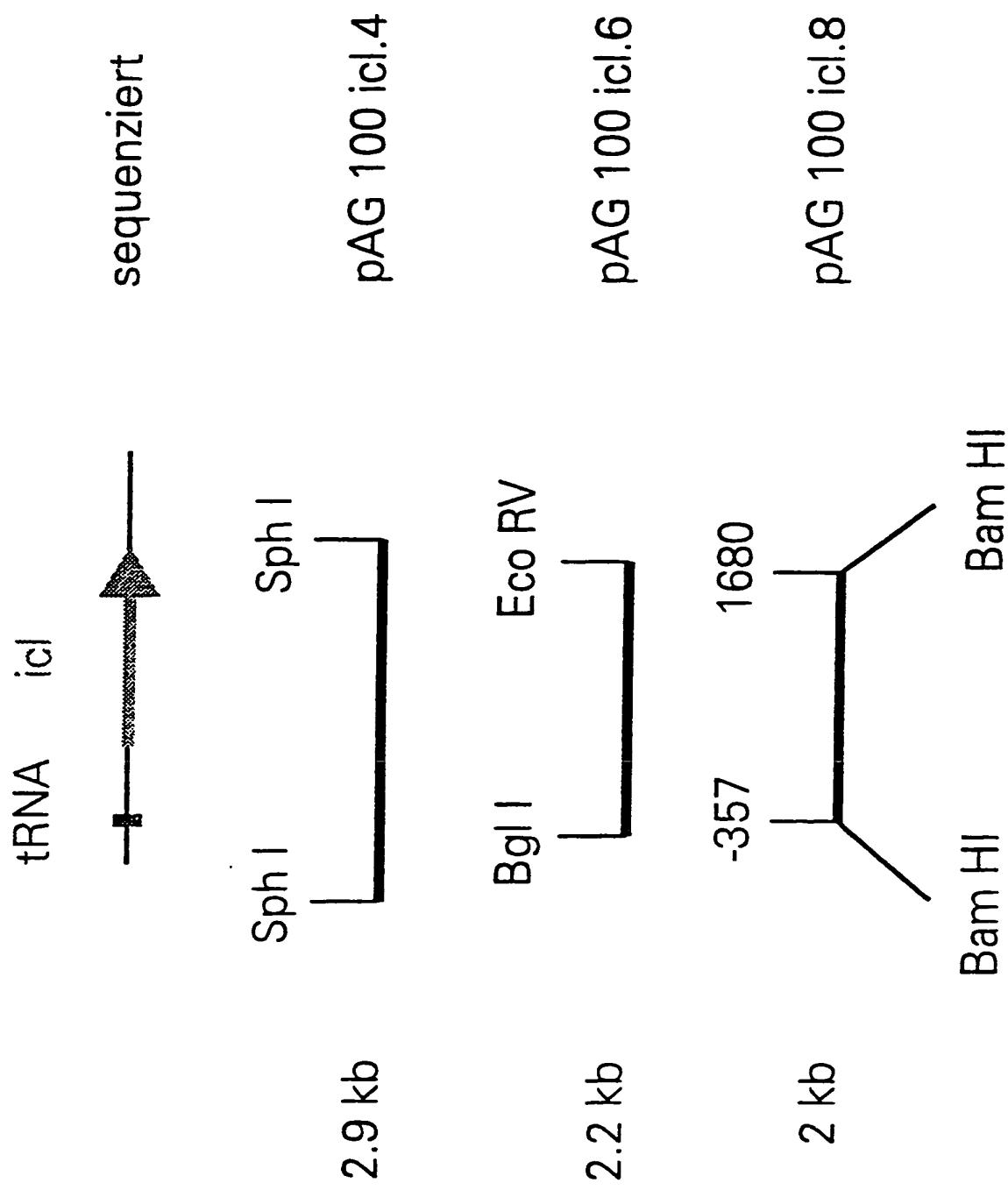
2,3 kb



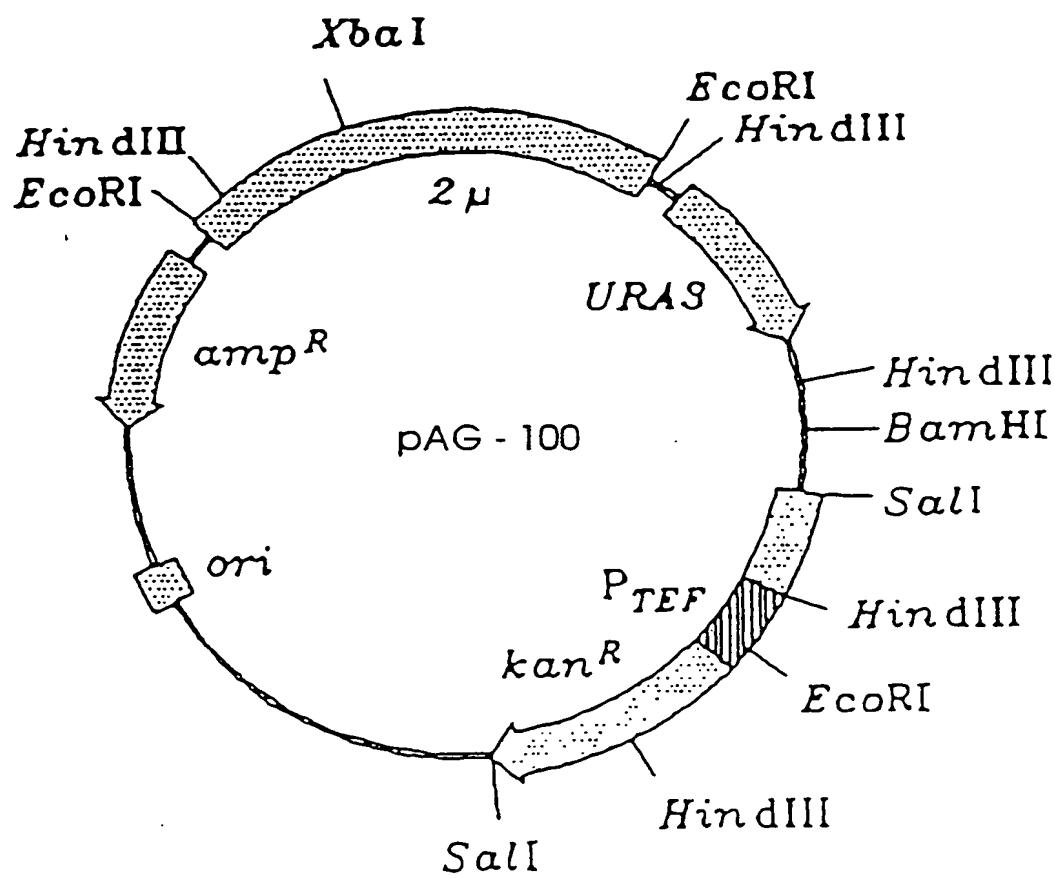
Fraktionen des Sau 3A - Verdaus  
nach Ultrazentrifugation

Figur 4

7/10



Figur 5



Figur 6

9/10

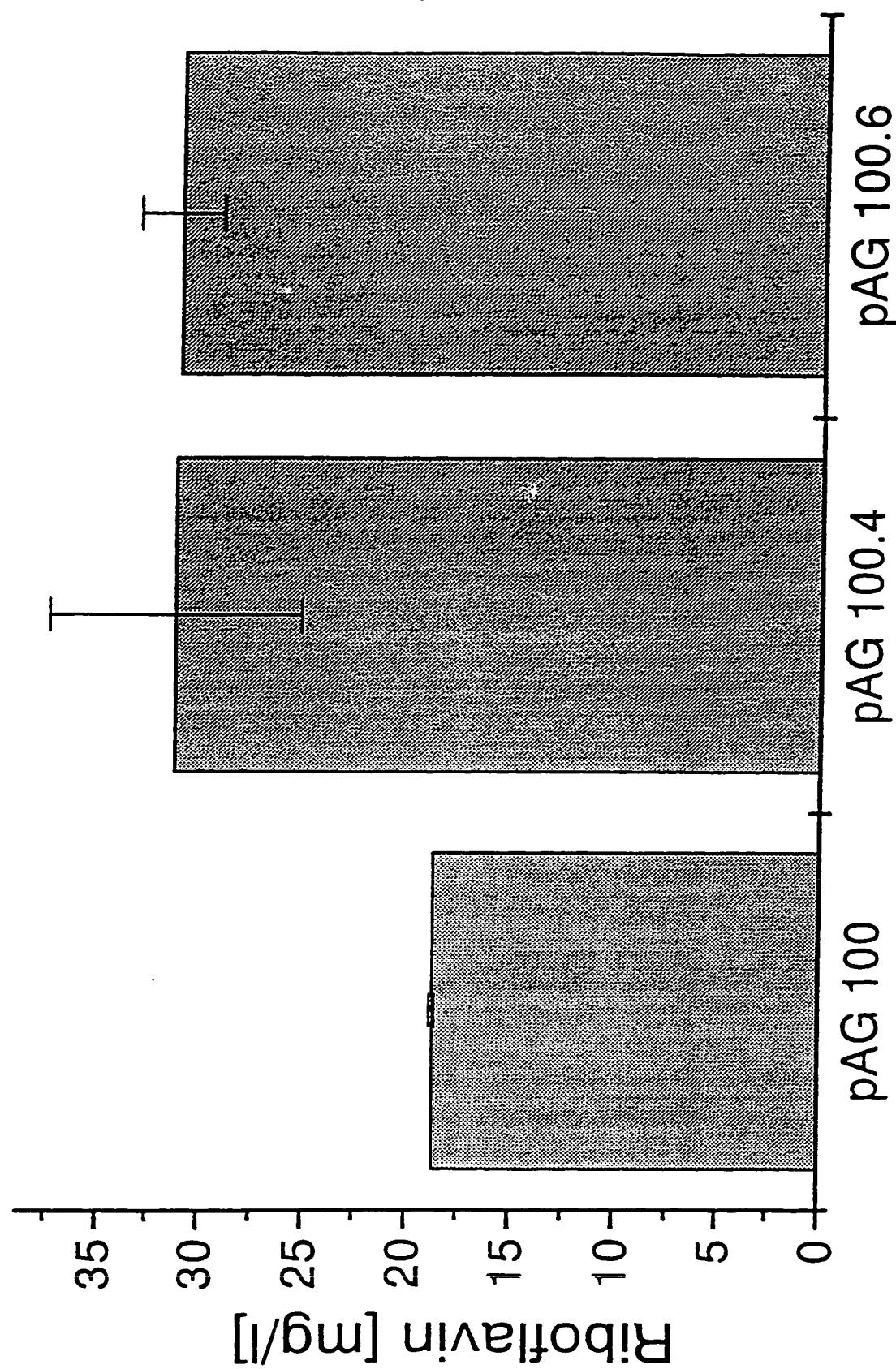
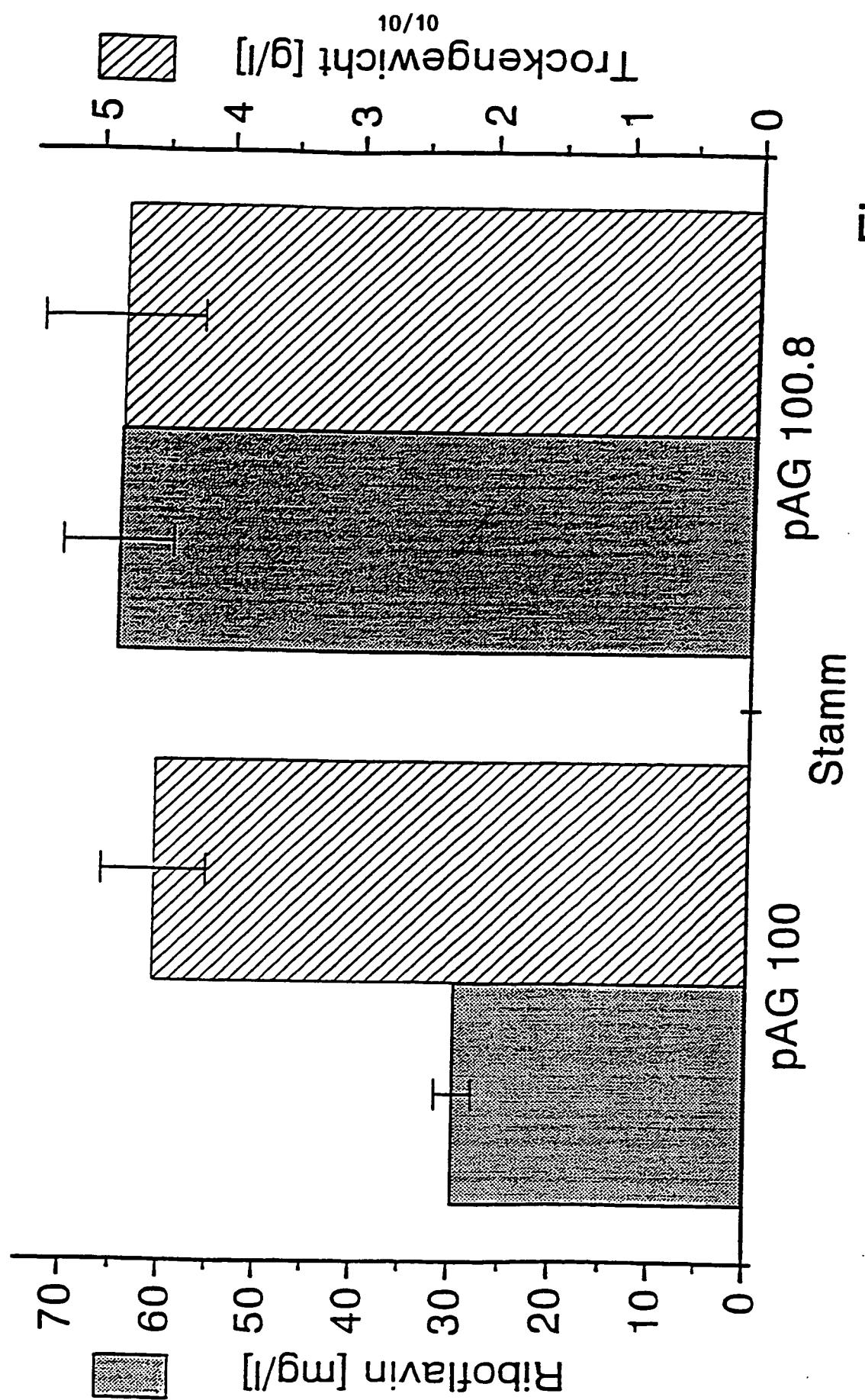


Figure 7  
Stamm



Figur 8

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 96/03009

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 6 C12P25/00 C12N15/60 C12N15/31

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C12P C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	<p>MICROBIOLOGY, vol. 142, no. 2, 1996, READING U.K., pages 411-417, XP002020315 SCHMIDT, G. ET AL.: "Inhibition of purified isocitrate lyase identified itaconate and oxalate as potential antimetabolites for the riboflavin overproducer <i>Ashbya gossypii</i>" see the whole document ---</p>	1-11
X, P	<p>MICROBIOLOGY, vol. 142, no. 2, 1996, READING, U.K., pages 419-426, XP002020316 SCHNMIDT, G. ET AL.: "Correlation of isocitrate lyase activity and riboflavin formation in the riboflavin overproducer <i>Ashbya gossypii</i>" see the whole document ---</p>	1-11 -/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 December 1996

Date of mailing of the international search report

18.12.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Douschan, K

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 96/03009

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MOL. GEN. GENET., vol. 241, 1993, pages 422-430, XP002020317 BARTH, G. UND SCHEUBER, T.: "Cloning of the isocitrate lyase gene (ICL1) from Yarrowia lipolytica and characterization of the deduced protein" see the whole document ---	1-11
A	EP,A,0 405 370 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 2 January 1991 cited in the application see the whole document ---	1-11
A	WO,A,93 03183 (TRANSKARYOTIC THERAPIES INC.) 18 February 1993 cited in the application see the whole document -----	1-11

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No  
PCT/EP 96/03009

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A-0405370	02-01-91	CN-A-	1049185	13-02-91
		JP-A-	3117489	20-05-91
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-9303183	18-02-93	AU-A-	1278192	02-03-93
		EP-A-	0596885	18-05-94
		JP-T-	6508983	13-10-94
		NZ-A-	240749	27-04-94
-----	-----	-----	-----	-----

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

nales Aktenzeichen

PT/EP 96/03009

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 C12P25/00 C12N15/60 C12N15/31

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 6 C12P C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X, P	MICROBIOLOGY, Bd. 142, Nr. 2, 1996, READING U.K., Seiten 411-417, XP002020315 SCHMIDT, G. ET AL.: "Inhibition of purified isocitrate lyase identified itaconate and oxalate as potentioal antimetabolites for the riboflavin overproducer <i>Ashbya gossypii</i> " siehe das ganze Dokument ---	1-11
X, P	MICROBIOLOGY, Bd. 142, Nr. 2, 1996, READING, U.K., Seiten 419-426, XP002020316 SCHNIMIDT, G. ET AL.: "Correlation of isocitrate lyase activity and riboflavin formation in the riboflavin overproducer <i>Ashbya gossypii</i> " siehe das ganze Dokument ---	1-11 -/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- \* A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- \* E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- \* L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- \* O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- \* P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- \* T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- \* X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- \* Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- \* & Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

5. Dezember 1996

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

18.12.96

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Douschan, K

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

nationales Aktenzeichen  
PCT/EP 96/03009

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	MOL. GEN. GENET., Bd. 241, 1993, Seiten 422-430, XP002020317 BARTH, G. UND SCHEUBER, T.: "Cloning of the isocitrate lyase gene (ICL1) from Yarrowia lipolytica and characterization of the deduced protein" siehe das ganze Dokument ---	1-11
A	EP,A,0 405 370 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 2.Januar 1991 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-11
A	WO,A,93 03183 (TRANSKARYOTIC THERAPIES INC.) 18.Februar 1993 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument -----	1-11

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

nationales Aktenzeichen

PCT/EP 96/03009

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP-A-0405370	02-01-91	CN-A-	1049185	13-02-91
		JP-A-	3117489	20-05-91
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-9303183	18-02-93	AU-A-	1278192	02-03-93
		EP-A-	0596885	18-05-94
		JP-T-	6508983	13-10-94
		NZ-A-	240749	27-04-94
-----	-----	-----	-----	-----